Aus der Univ. Hautklinik der Charité (Direktor: Prof. Dr. W. Frieboes)
und der Univ. Hautpoliklinik, Ziegelstr. (Leiter: Dozent Dr. S. Bommer),
Berlin.

Zur Technik fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Gerd Weddigen
aus Remscheid.

Tag der Promotion: 20. Januar 1938.

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. W.

M 433

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Professor Dr. Siebeck

Referent: Dozent Dr. Bommer

Korreferent: Professor Dr. Frieboes

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhalt.

1. Grundlagen 5
2. Bisherige Untersuchungen und Ergebnisse. . . 8
3. Apparatur 10
4. Technik optimaler Beleuchtungsstärke. . . . 14
5. Technik der Präparatherstellung. 17
6. Färbetechnik. 20
7. Ausblick. 25
8. Literatur. 26
9. Lebenslauf. 27

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543927_0072

Grundlagen.

Wird ein Körper von Lichtstrahlen getroffen, so kann er diese zurückwerfen oder durchlassen oder schließlich in sich aufnehmen, absorbieren. Wieviel er von dem auffallenden Licht reflektiert, verschluckt oder durchläßt, hängt von dem Einfallswinkel des Lichts, seiner Wellenlänge und der molekularen Struktur des Körpers und der seiner Umgebung ab. Durch die Strahlen sichtbarer Art, die durchgelassen oder zurückgeworfen werden, wird das Aussehen und die Farbe des Körpers bestimmt. Die vom Körper aufgenommenen Strahlen können in ihm mancherlei Wirkung hervorrufen. Am häufigsten ist die Umwandlung von absorbierter Lichtenergie in ungeordnete Wärmebewegung der Moleküle. Oder aber es können photochemische Vorgänge ausgelöst werden, wie z. B. die Schwärzung photographischer Platten. Eine dritte Möglichkeit der Energieumwandlung von absorbiertem Licht in einem Körper ist die Anregung zur Aussendung von neuen Strahlen. Letzteren Vorgang bezeichnet man mit Photoluminiszenz.

Photoluminiszenz äußert sich bei Gasen in Form der Resonanzstrahlung, auf die wir hier nicht eingehen wollen. An festen und flüssigen Körpern tritt die Photoluminiszenz in Form der Fluoreszenz und Phosphoreszenz auf. Phosphoreszierende Stoffe sind durch ein Nachleuchten gekennzeichnet, d. h. das sekundär ausgestrahlte Licht hält noch eine gewisse Zeit an, wenn das erregende Licht erlischt. Von Fluoreszenz dagegen reden wir, wenn die Dauer dieses Nachleuchtens gleich Null ist.

Da von der Lichtmenge, die auf einen fluoreszierenden Körper fällt, nur ein Teil absorbiert wird, und von der absorbierten Lichtmenge wiederum nur ein Teil zur Umsetzung in neu ausgestrahltes Fluoreszenz- bzw. Phosphoreszenz-Licht gelangt, ist es offensichtlich, daß die Lichtmenge der ausgestrahlten Fluoreszenz weit geringer ist als die des auffallenden Lichts. Wollen wir also Fluoreszenz-Erscheinungen beobachten, so wird meist das einfallende Licht, sofern es dem

sichtbaren Teil des Spektrums angehört, die schwächere ausgestrahlte Fluoreszenz überdecken. Nur wenige Substanzen weisen eine so starke Fluoreszenz auf, daß man diese sogar im Sonnenlicht beobachten kann, wie z. B. das Eosin. Wollen wir also bei schwächer fluoreszierenden Stoffen die Fluoreszenz wahrnehmen, ohne durch das einfallende, Fluoreszenz erzeugende Licht gestört zu werden, so bestrahlen wir den zu untersuchenden Stoff zweckmäßig mit einem Licht, das unser Auge nicht wahrnimmt, und zwar mit Ultraviolettstrahlen, d. h. Lichtstrahlen mit der Wellenlänge zwischen 400 und 300 $\mu\mu$. Nach einer von Stokes gefundenen Regel ist nun die Wellenlänge des erregenden Lichts immer kleiner als die des erregten. Bestrahlen wir also einen Körper mit Ultraviolettlicht, so wird, wenn überhaupt eine Fluoreszenz entsteht, diese eine größere Wellenlänge haben als die des Ultravioletten, und damit in den Bereich des sichtbaren Spektrums fallen, d. h. unserem Auge wahrnehmbar sein. Ultraviolettlicht eignet sich auch aus einem anderen Grunde besonders gut zur Beobachtung von Fluoreszenz-Erscheinungen. Es regt nämlich von allen Lichtarten fluoreszierende Stoffe am intensivsten zur Fluoreszenz an.

Um möglichst reines Ultraviolettlicht zu erhalten, gibt es im wesentlichen zwei Methoden. Die eine besteht darin, daß man das gemischte Licht einer normalen Lichtquelle, beispielsweise das einer Bogenlampe oder das Sonnenlicht durch ein Quarzprisma — (Glas absorbiert bekanntlich die U. V. Strahlen zum großen Teil) — in seine Spektralfarben zerlegt und dann den kurzwelligen Anteil von der Wellenlänge des U. V. durch Spalteinrichtungen herausblendet. Dies erfordert eine kostspielige Apparatur, einen sogenannten Monochromator. Die andere Methode versucht, durch geeignete Lichtfilter, alle Lichtstrahlen von anderer Wellenlänge als die des gewünschten U. V. Lichts zu absorbieren.

Die Stärke des sekundär emittierten Lichts ist abhängig von der Dichte der erzeugenden Strahlen und zwar wirkt nur der absorbierte Teil fluoreszenzerregend. Da die Menge des absorbierten Lichts von dem Einfallswinkel abhängt, ist auch mittelbar die Stärke der Fluoreszenz von dem Einfallswinkel des primären Lichtbündels abhängig. Ohne Beziehung zu diesem Winkel jedoch ist die Richtung des Fluoreszenzlichtes,

da es von einem neuen Emissionszentrum gleichmäßig nach allen Seiten ausgesandt wird.

Die auftretenden Fluoreszenzfarben sind nur bei einfach aufgebauten Verbindungen in ihrer Abhängigkeit von der Struktur des bestrahlten Stoffes und der Art der erzeugenden Strahlen hinreichend erklärt und definiert. Sobald aber der bestrahlte Körper komplizierten chemischen und physikalischen Aufbau zeigt, verläßt uns die deduktive Erkenntnis und wir sind an die Empirie gebunden. Jedenfalls können wir sagen, daß ein bestimmter fluoreszierender Stoff unter genau gleichen Versuchsbedingungen immer dieselben Fluoreszenzfarben zeigt. Die Schwierigkeit liegt nur darin, daß diese Bedingungen sich aus sovielen, zum Teil noch unbekannten Faktoren zusammensetzen, daß wir ihre Veränderungen nur mangelhaft in der Hand haben. Allerdings vereinfacht sich die Frage dadurch, daß die hier besprochenen Körper, die tierischen Gewebe, relativ unempfindlich gegen äußere Einflüsse in ihren Fluoreszenzerscheinungen sind.

Die Fluoreszenz ist bekanntlich in Technik und Industrie mit vielem Nutzen angewandt worden. Im Bereich der Medizin hat sie am ehesten bei den Gerichtsmedizinern als diagnostisches Hilfsmittel Eingang gefunden. Erst seit Stübel *) hat sich die Forschung der systematischen Untersuchungen am lebenden Körper zugewandt. Sowohl die Betrachtung der Körperoberfläche mit ihren groben Fluoreszenzphänomenen **) als auch die Mikroskopie von Gewebsschnitten ist seitdem von einzelnen Forschern zum Gegenstand ihrer Untersuchungen gewählt worden. Ausgedehnte Versuche in beiderlei Richtung sind von Bommer aufgestellt worden. Dieser stellte mir die Aufgabe, auf Grund seiner Vorarbeiten und der Arbeiten von Hamperl, die Technik fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen bei Gewebsschnitten der Haut weiter zu vervollkommnen.

---

*) Stübel, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 142, I. (1911).

**) Hierhin gehört auch die Beleuchtung des Operationsgebietes bei Laparatomien mit ultraviolettem Licht, die Havlicek ([15]) anwandte, um gleich mit unbewaffnetem Auge krankhafte von gesunden Geweben zu unterscheiden.

2. Bisherige Untersuchungen und Ergebnisse.

Wie schon erwähnt, kannten die reinen Naturwissenschaften schon lange die Fluoreszenz an ihren unbelebten Materien. So erklärt es sich, daß die ersten Beobachtungen von Fluoreszenz am Lebenden von Physikern *) und Chemikern gemacht wurden, so die blauweiße Fluoreszenz an Haut und Nägeln sowie die grünlichbläuliche der Augenlinse. Zwar wurden sie nur nebenbei erwähnt und bald wieder vergessen, bis als erster Biologe Stübel sich eingehender mit der Fluoreszenz befaßte und schon Erkenntnisse veröffentlichte, die noch heute unerläßlich für das Verständnis der vielseitigen Beobachtungen sind. So erkannte er, daß die Anwesenheit von Pigment und Hämoglobin die Fluoreszenz eines Gewebes unterdrückt oder mindestens die Farbe vom Blauweißen ins Gelbbraune verschiebt. Ferner zeigte er, daß die Intensität der Fluoreszenz vom Wassergehalt des Gewebes abhängt, denn je wasserärmer, desto stärker fluoresziert es. Interessant ist seine Bemerkung, daß die starke Fluoreszenz der Augenlinse eine Folge ihrer guten Fähigkeit ist, ultraviolettes Licht zu absorbieren, was wiederum einen natürlichen Schutz der sensiblen Elemente des Augenhintergrunds darstellt.

Erst 1924 greift Policard ([22]) die fluoreszenzanalytische Methode wieder auf. Er beleuchtete die Schnittfläche von experimentell erzeugten Sarkomen mit U. V. Licht und sah das Zentrum der Geschwulst rot fluoreszieren. Die Tatsache, daß dieses Zentrum nekrotisch war, genügte nicht zur Erklärung der Erscheinung, denn die Nekrosen der Randpartien zeigten keine Fluoreszenz. Policard kam zu dem Schluß, daß das Zentrum mit Bakterien besiedelt sein mußte, die Hämatoporphyrin bildeten oder in ihrer Umgebung anreicherten, ähnlich der von Hymanns ([17]) entdeckten roten Fluoreszenz kariöser Zähne. Ein Jahr später berichtet er über Beobachtungen an Bakterienkulturen, von denen die Gruppe der Tbc. Bazillen und gewisser Pilzarten charakteristische Fluoreszenzfarben zei-

*) Setschenow ([24]) z. B. hatte 1859 bei der spektrologischen Zerlegung des Sonnenlichts als Nebenbefund eine Fluoreszenz der Augenlinse bei Bestrahlung mit U. V. Licht beschrieben.

gen, während Staphylokokken, tetragene Pneumokokken und die meisten spez. Krankheitserreger nicht fluoreszieren.

Durch Verbesserung der U. V. Lampen, wovon noch im nächsten Abschnitt die Rede sein soll, war es möglich geworden, systematisch die menschlichen Organe auf ihre Fluoreszenz durchzuuntersuchen. Nachdem Bommer [1] 1926 die Fluoreszenz normaler Haut beschrieben hatte, folgen bald klinisch interessante Arbeiten über pathologische Hautveränderungen im U. V. Licht. Diese makroskopischen Untersuchungen gehen über den Bereich meiner Aufgabe hinaus. Ich will deshalb nur die Ergebnisse streifen.

So hat Keller [18] mit einer U. V.-Lampe das Vorkommen der Pityriasis versicolor auch auf der behaarten Kopfhaut nachgewiesen. Bommer [2] beschrieb eine charakteristische Fluoreszenzfarbe des Erythrasma und von Pilzerkrankungen der Haut und veröffentlichte wenig später eine Zusammenstellung [3] der Fluoreszenzerscheinungen an inneren Organen. In einer 1929 erschienenen Arbeit [5] entwickelt er eine Methode, die U. V.-Mikroskopie auch auf organische Schnitte anzuwenden und teilt seine Beobachtungen einer spezifischen roten Fluoreszenz an den Follikeln der Nase mit, die an anderen Talgdrüsen des menschlichen Körpers nicht auszulösen war. 1933 bezeichnet Bommer in der Dermatologischen Zeitschrift [4] die Fluoreszenzmikroskopie als eine besonders schonende Methode zur Darstellung von elastischen Fasern in der Haut, gegenüber der gebräuchlichen Elasticafärbung, sowie der Alkalisierung und Säurung.

3. Apparatur.

Ein Fluoreszenzmikroskop besteht im wesentlichen aus einer Lichtquelle, die besonders reich an U. V.-Strahlen ist, einem geeigneten Filter, das die langwelligen Strahlen aus dem erzeugten Licht absorbiert, einem Kondensorsystem, das das so erhaltene kurzwellige Licht auf das Objekt konzentriert und einem normalen Mikroskoptubus mit Objektiv und Okular und schließlich einem Filter, das die U. V.-Strahlen dem beobachtenden Auge fernhält und nur die im Objekt entstehenden Fluoreszenzfarben durchtreten läßt.

Als Lichtquelle wurden von Keller ([18]) und Bommer ([1]) zum Teil wassergekühlte Kromayer-Lampen verwandt. Policard ([23]) nahm die grundsätzlich ähnlich konstruierte Georges-Lampe, Type Gallois (ebenfalls Quecksilberdampf) zu seinen Versuchen. Beide Lampen haben eine relativ geringe Flächenhelligkeit, sodaß zur Erzielung ausreichender Lichtausbeute am Objekt entweder ein kostspieliges Kondensorsystem erforderlich ist, oder aber die Lampe sehr nahe an das Mikroskop gerückt werden muß, sodaß die Hitzewirkung ein längeres Arbeiten wenig angenehm macht. Dennoch hat Bommer mit dieser behelfsmäßigen Apparatur sehr gute Bilder erhalten.

Größere Flächenhelligkeit dagegen besitzen die Bogenlampen mit Eisenelektroden oder, wie Metzner ([20]) empfiehlt, solche mit Nickeldocht. Einen gleichen Metallichtbogen besitzt auch das von Reichert gebaute Fluoreszenzmikroskop. Der Lichtbogen zwischen Dochtelektroden brennt verhältnismäßig ruhig, während der von Haitinger ([8]) als spektroskopisch besonders günstig bezeichnete Eisenlichtbogen einer Luftkühlung der kurzgehaltenen Elektroden bedarf.

Um nun ein möglichst reines U. V.-Licht zu erhalten, werden in dem Strahlengang Filter angebracht, die das langwelligere Licht absorbieren und nur Strahlen von der Wellenlänge 340—330 $\mu\mu$ durchlassen. Ein solches Filter wurde schon 1903 von Wood beschrieben, das aus einer Kombination von Nitroso-Dimethylanilin-Gelatinefilm mit Kobaltglas, Signalgrün und einem Uraninfilm bestand. In der Wirkung gleiche Filter sind heute unter dem Namen U. V.-Dunkelglas und Uviolblau-Filter bekannt, die vor dem Wood'schen Filter den Vorteil

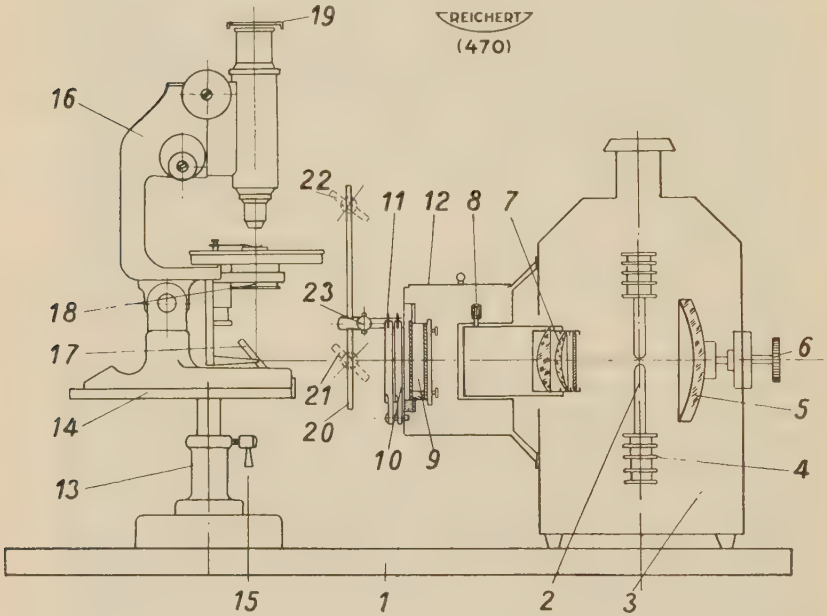
größerer Hitzebeständigkeit haben, sodaß sie in der Nähe des Eisenbrenners nicht so leicht springen.

Die Art der Konzentration des Lichtbündels auf das Objekt richtet sich danach, ob man dieses im durchscheinenden oder auffallenden Licht zu betrachten wünscht. Im ersteren Fall verwendet man nach Art eines normalen Mikroskops ein Linsensystem aus Quarz oder aus dem weniger kostspieligen U. V.-Glas, das die U. V.-Strahlen ziemlich unvermindert hindurchtreten läßt. Im anderen Fall geschieht die Konzentration durch ein Spiegelsystem. Metzner stellte die Lichtquelle in Höhe des Objekttisches auf, sammelte das Licht mit einem kugelrunden wassergefüllten Glaskolben, ähnlich einer Schusterkugel, in einem Lichtbündel, das dicht über die Ebene des Objekttisches hinweg einen kleinen Hohlspiegel traf. Dieser war unmittelbar neben dem zu betrachtenden Objekt angebracht und hatte seinen Brennpunkt im Objekt selbst. Er bestand aus einem chromierten Eisen, das U. V.-Licht besonders gut reflektiert.

Beim Reichert - Fluoreszenz - Mikroskop wird das U. V.-Licht durch ein Hohlspiegelsystem von oben auf das Objekt geworfen. Metzner bemängelt an dieser Methode den steilen Einfallswinkel des Lichtes, sodaß zuviel U. V.-Licht in den Mikroskoptubus reflektiert wird, was allerdings m. E. beim durchscheinenden Licht noch viel mehr der Fall ist. Um das Auge vor dem schädlichen U. V.-Licht zu schützen, wird ja auch allgemein auf das Okular ein Farbfilter gesetzt, das nur die Fluoreszenzfarben, nicht aber das U. V.-Licht hindurchtreten läßt. Überdies kann das Objektiv-Okularsystem von normaler Ausführung sein, da ja die Fluoreszenzfarben von einer Wellenlänge sind, die nicht durch gewöhnliches Glas behindert werden. Da die Lichtstärken der Fluoreszenzfarben verhältnismäßig gering sind, ist die Unterbringung des Fluoreszenzmikroskopes in einem verdunkelten Raum notwendig.

Bei den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen wurde ausschließlich mit dem Reichert-Fluoreszenzmikroskop gearbeitet, das ich noch kurz beschreiben möchte. Die Aufsichtsskizze läßt erkennen, daß die Lichtquelle 2, eine kombinierte Bogenlampe mit einer Dochtkohlen- und einer Metallelektrode, in einem lichtdichten Lampengehäuse 3 untergebracht ist. Ein in Richtung der optischen Achse verschieblicher Metallhohlspiegel 5 wirft das Licht durch einen Kollektor 7,

dessen Brennpunkt durch Schneckengang 8 auf der optischen Achse verschoben werden kann. Um das Linsensystem vor Hitze und abspritzenden Metallteilchen des Lichtbogens zu schützen, ist zwischen Lampe und Kollektor noch ein auswechselbares dünnes U. V.-Glas geschaltet.



Der besseren Übersicht halber ist in dieser schematischen Skizze das Mikroskop um 90° um seine Längsachse gedreht gezeichnet. In Wirklichkeit ist der Henkel des Mikroskops dem Beschauer zugekehrt.

Da das ausschwenkbare U. V.-Dunkelglasfilter 10 außer für das unsichtbare U. V.-Licht auch für sichtbares Rot und Wärmestrahlen durchlässig ist, ist in den Strahlengang eine planparallele Küvette 9 mit Kupfersulfatlösung angebracht, die diesen unerwünschten Teil des Spektrums weitgehend absorbiert. Nr. 18 zeigt den U. V.-Glaskondensor des Mikroskops, Nr. 19 das Sperrfilter, das die U. V.-Strahlen, die direkt durch das Objekt fallen, dem Auge fernhalten. Ein ausschwenkbares Periskopspiegelsystem 21—23 zur Auflichtbeleuchtung

besteht aus einem Planspiegel 21 und einem Hohlspiegel 22. Zur vergleichsweisen Betrachtung von normalgefärbten Präparaten in Weißlicht wird das U. V.-Dunkelfilter ausgeschwenkt und ein Milchglasfilter 11 vorgesetzt, da das ungefilterte Licht der Bogenlampe zu stark blenden würde.

4. Technik optimaler Beleuchtungsstärken.

Die Firma C. Reichert liefert zu ihrem Fluoreszenzmikroskop eine Gebrauchsanweisung, die ein guter Anhalt für die Handhabung ist. Es bedarf jedoch einiger Zeit, bis man sich so mit den einzelnen Handgriffen vertraut gemacht hat, daß man sie fast instinktiv während seiner Untersuchung anwendet, ohne vom eigentlichen Gang des Versuchs abgelenkt zu werden. Zur Erleichterung habe ich daher noch einiges hinzuzufügen.

Vorschriftsmäßig soll man zunächst zur Zentrierung des Lichts den Lichtbogen mittels dafür bestimmter Schneckentriebe (die in der schematischen Skizze nicht dargestellt sind) so in Höhen- und Seitenrichtung verstellen, daß durch den Kollimator 7 ein scharfes Bild des Lichtbogens auf dem Mikroskopspiegel 17 entworfen wird. Dieses Bild soll dann durch Seitenverschiebung des Lichtbogens auf den seitlichen Rand des Spiegels verlegt werden. Ist dies geschehen, soll man mittels des Triebes 6 den Hohlspiegel 5 so verstellen, daß ein Spiegelbild des Lichtbogens auf dem gegenüberliegenden Rand des Mikroskopspiegels erscheint. Jetzt wandern durch abermalige Seitenverstellung der Bogenlampe die beiden Bilder des Lichtbogens auf die Mitte des Mikroskopspiegels zu und kommen hier zur Deckung.

In Abweichung von dieser Vorschrift kontrolliere ich die Zentrierung des Lichtkegels nicht auf dem kleinen Mikroskopspiegel, weil hier die Bilder vom Lichtbogen, das direkt entworfene und das vom Reflektor zurückgeworfene, sich nur undeutlich voneinander abheben und selbst durch das empfohlene fluoreszierende Stück Fließpapier (mit Aeskulin getränkt) nicht klarer werden. Ich stellte vielmehr meine Apparatur so auf, daß das Mikroskop etwa 50 cm von der weißen Wand der Dunkelkammer entfernt war. Jetzt entwirft der Kollimator ein scharfes Schattenbild vom Mikroskopspiegel an der Wand, das von einem hellen Saum des Lichtkegels umrandet ist. Dieser Lichtsaum muß nun möglichst schmal und gleichmäßig um das Schattenbild verteilt sein. Überragt er an einer Stelle den Schatten um ein Weniges, so genügt ein Griff zum Trieb für Seiten- und Höhenverstel-

lung an der Bogenlampe, um den Lichtbogen hinter den Schatten zu verweisen. Die Einstellung des Reflektors geschieht entsprechend der Gebrauchsanweisung, nur daß man hier nicht scharfe Bilder des Lichtbogens an der Wand erhält, sondern einen diffusen Schein, und als Symmetrieachse die Mittellinie des Spiegelschattens nimmt.

Eine weitere und feinere Kontrolle gestattet der Lichtschein an der Zimmerdecke, den man bei herausgeklappter Zentralblende erhält. Das Mikroskopokular projiziert hier ein scharf begrenztes Lichtbündel, dessen Ausschnitt dem Gesichtsfeld im Mikroskop entspricht. Ein Griff an der Höhen- und Seitenverstellung der Lampe ergibt auch hier ohne Schwierigkeiten die optimalsten Lichtverhältnisse: ein überall gleichmäßig erleuchtetes Feld.

Hier sei auch gleich auf ein Mittel hingewiesen, mit dem es gelingt, irgend eine Stelle im Gesichtsfeld deutlicher zu machen und stärker fluoreszieren zu lassen: das ist die Konzentration des Lichtbündels auf die gewünschte Stelle. Man verschiebt zu diesem Zweck den Kollimator cr. 1 cm in Richtung der optischen Achse und erreicht, genau so wie zur Beleuchtung beim Gebrauch von stärkeren Vergrößerungen, einen Schnitt des Lichtbündels in der Ebene des Objekts, das jetzt im mikroskopischen Bild diffus erleuchtet erscheint, mit einer besonders hellen Stelle, die nun mit Hilfe der Triebschrauben der Lampe bequem in den Ausschnitt des Bildes zu leiten ist, den man genauer zu betrachten wünscht. Durch die Konzentration des U. V.-Lichts treten häufig erst jetzt die Fluoreszenzerscheinungen in genügender Stärke hervor. Die Verschiebung des Lichtflecks hat vor dem Verschieben des Kreuztischs den Vorzug der besseren Orientierung.

Auf eine Fehlerquelle im Beleuchtungsapparat möchte ich noch aufmerksam machen. Fällt beim Arbeiten mit fluoreszierenden Farben ein diffuser farbiger Fluoreszenzschein des Präparates auf, so denke man immer erst daran, noch einmal die Sauberkeit des optischen Beleuchtungssystems, Kondensor und Spiegel, zu prüfen, weil hier nur geringste Stäubchen des Farbstoffs genügen, um durch Eigenfluoreszenz dem farblosen U. V.-Lichtstrahl seine Farbe diffus mitzuteilen und den Eindruck zu erwecken, als wäre das Präparat überfärbt.

Soweit die günstigsten Bedingungen der objektiven Beleuchtungsstärke. Um auch subjektiv eine möglichst gute Hel-

ligkeit zu erzielen, ist die erste Vorbedingungen gute Adaption an die doch relativ geringe Helligkeit der Fluoreszenzfarben. Diese wird am schnellsten erreicht, wenn die ganze Versuchsanordnung in einem völlig verdunkelten Zimmer untergebracht wird. Allein, bei längerem Arbeiten, wobei es sich nicht vermeiden läßt, daß die Zimmerbeleuchtung zum Färben der Präparate immer wieder eingeschaltet wird, stellten sich beim Verfasser Ermüdungserscheinungen der Augen ein. Hier Abhilfe zu schaffen, sollen folgende kleine Winke erwähnt sein. Als Arbeitsbeleuchtung verwende man eine Rubinglaslampe, wie sie in photographischen Dunkelkammern üblich ist.

Um den Tubus lege man einen kleinen Papierschirm wie eine Halskrause, der verhindern soll, daß vom Mikroskopspiegel U. V.-Strahlen am Tubus vorbei ins Auge fallen. Abgesehen von der offensichtlichen Augenschädigung stört die blaue Fluoreszenz der Augenlinse bei direkter Bestrahlung beträchtlich.

Aus demselben Grunde kann man die Beobachtungsfensterchen im Lampenkasten mit dem gleichen Filter versehen, wie er als Schutzfilter auf das Okular gesetzt wird.

Für Brillenträger, die auch während des Mikroskopierens ihre Gläser aufbehalten, empfehle ich Vorsatzgläser aus demselben Filterglas.

5. Technik der Präparatherstellung

1. Gefrierschnitte.

Gefrierschnitte, die in üblicher Weise fixiert und entwässert sind, eignen sich für fluoreszenzanalytische Untersuchungen nur da, wo es sich daraum handelt, schnelle Diagnosen oder Reihenversuche zu machen, nicht aber für Dauerpräparate. Beim Eindecken muß nämlich bedacht werden, daß der gebräuchliche Kanadabalsam selbst fluoresziert und jede Beobachtung unmöglich macht. Wir helfen uns hier durch Eindecken mit dem nicht fluoreszierenden Glycerin, das den großen Nachteil hat, daß die Deckgläser leicht verrutschen und nur schwer mit einem Kitt auf dem Objektträger fixiert werden können. Ein Paraffinsaum zum Abdichten verbietet sich aus denselben Gründen. Ferner achte man beim Eindecken mit Glycerin darauf, daß das Xylol vorher vom Objektträger in der Umgebung des aufgeklebten Schnittes mit trockenem Lappen abgewischt wird. Bei einiger Übung wird man dann noch soviel Xylol abdünsten lassen, daß das Präparat gerade noch aufgehellt bleibt. Auf diese Weise wird verhindert, daß zu große Mengen Xylol mit dem Glycerin in Verbindung kommen, wodurch nur unnötige störende Xylolblasen entstehen, da sich die beiden Flüssigkeiten nur sehr schwer ineinander lösen. Das zum Aufkleben der losen Schnitte verwandte Eiweißglycerin stört dagegen nicht, weil die aufsteigende Alkohol-Xylol-Reihe hiervon auch die letzten Spuren auslöst; obschon für die später beschriebenen Färbemethoden ein sehr gewissenhaftes Aufkleben geboten ist, wenn man es nicht vorzieht, die unaufgezogenen Schnitte zu färben. In diesem Falle drückt man den gefärbten Schnitt fest auf den Objektträger und nimmt die Entwässerung und Aufhellung durch Auftropfen aus einem Tropffläschchen vor.

2. Paraffinschnitte.

Die Beobachtungen über die Dauer der Eigenfluoreszenz gehen bei den verschiedenen Autoren auseinander *). Allen gemeinsam aber ist die Feststellung, daß, je frischer ein Schnitt ist, um so deutlicher die Fluoreszenz. Unter diesem Gesichtspunkt allerdings sind die Paraffinschnitte den Gefrierschnitten unterlegen, da sie zu ihrer Herstellung etwa 48 Stunden länger gebrauchen. Bei Färbungen jedoch spielt die Eigenfluoreszenz eine untergeordnete Rolle und die Affinität der Farbstoffe zu ihren spezifischen Gewebsanteilen wird nach meinen Beobachtungen in den 2 Tagen der längeren Behandlungsdauer nicht geringer.

Da im übrigen die Klarheit der Fluoreszenzerscheinungen mit Abnehmen der Dicke des Schnittes steigt (Baroni verlangt sogar Schnitte von 2μ), leuchtet ein, daß ein Paraffinschnitt dem Gefrierschnitt vorzuziehen ist. Da Paraffin selbst fluoresziert, kommt alles darauf an, es nach dem Schneiden peinlich genau mit Xylol auszuwaschen **). Es gelingt dies, wenn man das Xylol öfter erneuert (halbstündlich, etwa 4—5 mal). Nach erfolgter Entparaffinierung entsteht in der folgenden absteigenden Alkoholreihe eine weitere Fehlerquelle. Bleiben nämlich noch Spuren von Xylol im Präparat haften, so bildet sich mit dem Wasser der minder konzentrierten Alkohole ein zarter weißer Schleier, der als solcher zwar nur bei stärkeren Xylolverunreinigungen schon dem unbewaffneten Auge auffällt, der aber später im U. V.-Licht schon in kleinsten Mengen als diffuser blauer Schimmer fluoresziert. Ein gleicher Schimmer kann auftreten, wenn man nach der wässrigen Färbung nicht gründ-

---

*) Die von Bommer ([5]) in Formol fixierten, durch Alkohol entwässerten und in Glycerin eingebetteten Gefrierschnitte hielten ihre Fluoreszenzerscheinungen 2—3 Wochen bei. Hamperl ([9]) verwandte außerdem die übliche Einbettung in Paraffin mit Benzol und Aceton als Zwischenharz und deckte die Paraffinschnitte in reinem Paraffinöl ein und umrandete das Deckglas mit venetianischem Lack. So gelang es ihm, die Fluoreszenzerscheinungen über ein Jahr zu erhalten.

**) Hier sei die interessante Mitteilung Danckwortts ([7]) erwähnt, daß Paraffin, dessen Fluoreszenz bei der subjektiven Betrachtung stören würde, bei der mikrophotographischen Aufnahme schwarz erscheint und so im Gegenteil die Kontraste erhöht.

lich entwässert *). Auch hier kommen Wasserreste mit dem aufhellenden Xylol in Berührung. Grundsatz ist also: sehr sauber arbeiten, Alkohol und Xylol oft wechseln. Objektträger aus U. V.-Glas erübrigen sich m. E. Was im vorigen Abschnitt über Klebmittel gesagt wurde, gilt auch hier. Zum Eindecken wurde Paraffinium liqu. genommen, das nach Erös (6) als purissimum nicht fluoresziert. Es empfiehlt sich eine Beschriftung der Objektträger mit Diamant vorzunehmen, um bei der schlechten Beleuchtung der Dunkelkammer die Präparatseite zu erkennen, was sonst bei einem Präparat, das gerade aus dem Farbbad genommen ist und abgetrocknet werden soll, nicht möglich ist.

*) Mangelnde Entwässerung nach dem Härten des frischen, ungeschnittenen Präparates macht sich bekanntlich schon beim Schneiden bemerkbar.

6. Färbetechnik.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder haben insofern Ähnlichkeit mit denen der Dunkelfeldmethode, als das, was im Hellfeld dunkel erscheint, im Fluoreszenzmikroskop aufleuchtet und umgekehrt. Die gewöhnlichen Färbemethoden, wie H. E. und Weigert, sind daher für unsere Zwecke ungeeignet. Es lag nahe, nach Farben zu suchen, die eine ähnliche spez. Affinität zu einzelnen Gewebsanteilen haben, die aber im U. V.-Licht fluoreszieren.

Als erster hat es Bommer [5] mit dem grünlich fluoreszierenden Trypaflavin versucht. Er färbte frische Gewebsschnitte mit einer wässrigen Trypaflavinlösung von einer Verdünnung 1 : 400 000 = 15 Sekunden lang, spülte sie in Wasser ab und bettete sie in Wasser ein, um sie dann unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Er kam zu interessanten Ergebnissen. Trypaflavin färbt ausschließlich die Kerne, nur fiel dabei auf, daß die Kerne des Bindegewebes in einem anderen Farbton fluoreszieren als die Kerne der Epithelien und Gefäßendothelien. Es ist das Verdienst von Hamperl, groß angelegte Reihenuntersuchungen gemacht zu haben, über die Eignung verschiedenartigster Fluoreszenzfarbstoffe für fluoreszenzmikroskopische Zwecke. Es zeigt sich dabei, daß eine große Anzahl von Chemikalien von vornherein deshalb ausscheiden mußte, weil sie sehr schnell in Lösung des eindeckenden Mediums gingen. Eine andere Gruppe dagegen wurde von Hamperl selbst als sehr geeignet bezeichnet für elektive Färbungen bestimmter Gewebsbestandteile, wie Kerne, elastische Fasern etc.

Ich habe mich im Folgenden an diese Auswahl optimaler Farbstoffe gehalten, die mir die Firma Dr. K. Hollborn, Leipzig, in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte. Es sind dies: Berberinsulfat, Aurophosphin, Thiazogelb, Thioflavin und Geranin. Wenn es um die Frage geht, ist dieses oder jenes Zellelement besonders vermehrt oder qualitativ verändert, so wird man mit der spez. Färbung gerade dieses Zellelements auskommen. In den wenigsten Fällen allerdings wird man bei dieser Frage stehen bleiben. Da die ungefärbten Teile des Präparates im Fluoreszenzmikroskop dunkel bleiben (wenn sie sich nicht durch Eigenfluoreszenz abheben), ist eine Orientie-

rung, geschweige denn eine Diagnose fast unmöglich. Was liegt also näher, als auch diese dunkle Umgebung mit fluoreszierenden Farbstoffen aufzuhellen und analog den normalen histologischen Gegenfärbungen kontrastreich zu machen.

Weil ich mich auf die genannten Farben beschränken wollte, galt es zunächst, festzustellen, ob sich nicht durch Mischung zweier Farbstoffe störende Ausfällungen ergaben, oder gar neue Fluoreszenzfarben im U. V.-Licht entstanden. Das Ergebnis, das mit Mischungen von Lösungen 1 : 1000 gewonnen wurde, ist folgender Tabelle zu entnehmen.

	Berbs.	Auroph.	Thiofl.	Thiazg.	Fluor.-Farbe	Färbt	Verdünnung
Geranin	+++	—	—	—	blau (rot in alten Präp.	Fett	1 : 10 000
Thiazolgelb	+ 1)	+ 2)	—		gelb-gelbgrün	koll. Fasern	1 : 100 000
Thioflavin	++	+ 3)			blau	Mark-scheide	1 : 1000 000
Aurophosphin	—				grün	Schleim	1 : 50 000
Berberinsulfat					gelb	Kerne	1 : 500 000

Die auftretenden unlöslichen Niederschläge sind je nach Intensität mit 1—3 Kreuzchen gekennzeichnet. Es erhellt, daß die Kombination Berberinsulfat-Geranin die ungünstigste ist. Mit bloßem Auge war der Niederschlag bei den schließlich benötigten Konzentrationen in vitro nur im seitlich auffallenden Licht sichtbar, nach Art des Tyndalleffekts. Im empfindlichen Fluoreszenzmikroskop aber war die störende chemische Umsetzung deutlich zu sehen als kleinste fluoreszierende Körnchen, wenn man ein beliebiges Präparat mit dieser Farbmischung färbte. Wurde dagegen das Gemisch durch ein dichtes Filter geschickt, so blieb die Lösung klar.

Neu entstandene Mischfarben wurden nur bei den Kombinationen Berberinsulfat-Thiazolgelb [1]) als violett und bei Aurophosphin-Thioflavin [3]) als grün beobachtet. Der Niederschlag [1]) und [2]) konnte mit Ammoniak gelöst werden, was theoretisch interessant sein mag, praktisch aber belanglos ist, weil bei den zum Färben erforderlichen Konzentrationen eine Ausflockung auch im Mikroskop nicht festgestellt werden konnte.

Bei den eigentlichen Färbeversuchen wurde zunächst folgender Versuchsgang gewählt. Die Präparate wurden zur

wässrigen Färbung in der üblichen Weise mit den angeführten Kautelen vorbereitet und dann nach Vorschrift der Arbeit von Hamperl zur progressiven Färbung 18 Std. lang in die entsprechend verdünnte Lösung der ersten Farbe gelegt. Eine Kontrollbeobachtung zeigte dann im Mikroskop die schöne elektive gelbe Fluoreszenz z. B. der Kerne, wenn es sich um Berberinsulfat handelte. Nach kurzer Wässerung folgte der ebenfalls 18 Std. lange Aufenthalt in der zweiten Farblösung, z. B. Geranin. Jetzt mußte ich leider feststellen, daß zwar die zweite Färbung in normaler Form Neutralfett rot fluoreszieren ließ, daß aber die Färbung der Kerne stark ausgeblaßt war, was nur so zu erklären war, daß während der zweiten Färbung das Berberinsulfat wieder ausgewaschen wurde *). Den Beweis dieser Überlegung brachte der Versuch, die erste Farbe durch 18stündige Wässerung in Aqua dest. wieder auszulösen, was auch gelang. Die Versuchsanordnung wurde darauf wie folgt geändert:

Die vorbereiteten Schnitte gelangten in eine Mischung von 2 Farblösungen zu gleichen Teilen, um bei unserem Beispiel zu bleiben also ein Teil Berberinsulfat $1 : 10^5$ und Geranin $1 : 10^4$, und verblieben dort 18 Std. **). Der Erfolg war meist ausgezeichnet. Das Fett des Unterhautzellgewebes und der Haarbalgdrüsen fluoreszierten leuchtend rot, die Kerne des ganzen Präparates hellgelb, oft auch noch die oberflächlichste Schicht der Epidermis als gelber Saum. Die blaue Eigenfluoreszenz der kollagenen Fasern war gut erhalten. In manchen Fällen jedoch überwog bald die eine, bald die andere Farbe und hatte die andere nahezu ausgelöscht. Von diesen Mißerfolgen wird noch zu reden sein.

Der Nachteil der progressiven Färbung ist ihre lange Dauer. Hampel schlägt vor, mit konzentrierten Lösungen zu arbeiten und entsprechend die Färbezeit zu verkürzen. Dahingehende Versuche führten zu keinem einheitlichen Ergebnis. Es lassen sich zwar auf diese Weise z. B. mit einer 5% Berberinsulfatlösung schöne Kernfärbungen erzielen, doch war es unmöglich, eine konstante Färbezeit zu ermitteln. Es scheint

*) Ähnliche Erfahrungen machte ich bei allen anderen Kombinationen.

**) Man könnte einwenden, in einer solchen Mischung ist die doppelte Menge Wasser, wie in den einzelnen Komponenten, doch geht es hier ja um den Partiarlösungsdruck, und der ist in beiden Fällen derselbe.

nämlich die Färbbarkeit von vielen Faktoren abhängig zu sein, wie Frische des Präparats, Art des Gewebes, die schwer konstant zu halten sind. Die Gefahr des Überfärbens ist bei den konzentrierten Lösungen deshalb gering, weil ohne weiteres ein Zuviel durch kurzes Wässern entfernt werden kann, im Gegensatz zur Überfärbung bei der progressiven Methode. Im ersteren Fall hat wohl der Farbstoff nicht genügend Zeit, eine innige Verbindung mit dem Gewebe einzugehen. Hier ist die progressive Färbung schon besser zu dosieren.

Dem Verfasser standen zu seinen Versuchen immer nur wenige Stunden am Tage zur Verfügung, und mußten sie mal aus irgend einem Grunde einen Tag ausgesetzt werden, so half er sich mit dem einfachen Verfahren, die Farblösungen entsprechend der längeren Färbedauer im gleichen Maße zu verdünnen. Die Ergebnisse waren die gleichen. Das war vorauszusehen, denn ob nun x Teile 18 Std. oder ob $^{x}/_{3}$ drei mal 18 Std. auf das Gewebe einwirken, ist im Effekt dasselbe.

Bis zu diesem Punkt ist die Präparatbehandlung einwandfrei. Allein, bei der nun folgenden Wässerung und Aufhellung erwiesen sich die in der normalen Histologie verwandten Methoden als unzulänglich. Abgesehen von der schon erörterten Fehlerquelle bei ungenügender Entwässerung zeigt sich eine außerordentliche Labilität der Kombinationsfärbungen. Bald wurde die eine, bald die andere Farbe mehr ausgewaschen, bald beide gleichmäßig, ohne daß es gelungen wäre, den Grund ausfindig zu machen. Zur Kontrolle mit Wasser eingedeckte, kombiniert gefärbte Schnitte verdarben in längstens 2 Tagen und schieden als Vergleichsobjekt aus. Die wenigen Präparate, die die Alkohol-Xylolreihe durchliefen, ohne ihre Fluoreszenz einzubüßen, wurden, wie beschrieben, in Paraffinum liqu. puriss. eingedeckt und unter Lichtabschluß aufbewahrt. Doch schon nach 1—4 Tagen waren die Färbungen nur noch als ganz schwacher Fluoreszenzschein festzustellen. Am längsten hielten sich die Farben noch in den schon in vivo abgestorbenen Teilen, wie Haarschäften und verhorntem Epithel, als schmaler Saum, lange auch noch die blaue Eigenfluoreszenz des Bindegewebes.

Hamperl benutzte zu seinen Färbeversuchen als Testobjekt normale menschliche Gaumenbögen, die einige Stunden nach dem Tode Leichen entnommen und in Formol fixiert wurden. Mir kam bei meinen Untersuchungen das reichhaltige Ma-

terial der Charité-Hautpoliklinik an frischen Probeexcisionen der Haut zugute, die ich in der beschriebenen Weise vorbehandelte. Naturgemäß überwogen die lupus- und cancroidverdächtigen Präparate. Zur Kontrolle betrachtete ich häufig vergleichend neben den fluoreszenzgefärbten Schnitten, solche vom gleichen Schnitt, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt waren, im Tageslichtmikroskop. Ein unterschiedliches Verhalten in der Färbbarkeit und den Fluoreszenzfarben der einzelnen Gewebselemente, jenachdem sie anscheinend normal oder offensichtlich pathologisch verändert waren, konnte ich, so oft ich darauf achtete, nicht feststellen. Lediglich fiel auf, daß in den Zentren der Lupusknötchen keiner der besprochenen Fluoreszenzfarbstoffe haftete, im Fluoreszenzmikroskop diese Zentren als dunkle Flecken in blaßgrauer Umgebung erschienen und daß im Gegenteil die Hornperlen eines alten Cancroids, das mit Thiazolgelb gefärbt wurde, in hellem Gelbgrün leuchteten, während das umgebende lebende Epithel nur seine blaue Eigenfluoreszenz zeigte.

7. Ausblick.

Offenbar liegt bei den zuletzt angeführten Mißerfolgen der Mangel in der Entwässerung durch Alkohol. Es wäre noch zu versuchen, ob der Ersatz des Alkohols durch andere Chemikalien z. B. Aceton eine schonendere Behandlung der Färbungen bedingt. Ich könnte mir auch denken, daß eine Veränderung der Konzentrationsfolge der Entwässerungsreihe im Sinne eines steileren Anstiegs und damit einer Verkürzung der Behandlungszeiten zu besseren Ergebnissen führt. An dieser Stelle gilt es jedenfalls noch manche Fragen zu lösen. Denn wenn es gelingen sollte, durch geeignete Methoden die Farben genügend zu fixieren, so sind die Kombinationsfärbungen mit ihren guten Kontrasten dazu angetan, der Histologie neue Gebiete zu erschließen. Ich verweise hier nochmals auf die bedeutsame Feststellung Bommers, daß die mit Trypaflavin gefärbten Kerne in verschiedenen Farben fluoreszieren, je nach dem sie der epithelialen oder mesenchymalen Reihe angehören.

Eine weitere Möglichkeit, die Bilder gelungener Färbungen festzuhalten, eröffnet die Erfindung der neuen Agfacolor Farbenfilme, die vorläufig erst nur als Normalfilm hergestellt werden und sich deshalb für Aufnahmen mit der Mifilmca eignen. Bei den wechselnden Lichtstärken der Fluoreszenzerscheinungen wird die Bestimmung der Belichtungszeit einige Schwierigkeiten machen. Die empfohlenen photoelektrischen Belichtungsmesser nämlich sind für diese schwachen Lichtintensitäten zu unempfindlich. Da kommt der relativ geringe Preis der Filme, die für 18 Bilder gedacht sind, sehr zu statten, um durch eine Reihe von Probeaufnahmen die günstigste Belichtungszeit zu finden.

8. Literatur.

1. Bommer: Dermatol. Wschr. 82, 1926.
2. „ Klin. Wschr. 24, 1927.
3. „ Klin. Wschr. 36, 1927.
4. „ Dermatol. Wschr. 67, 1933.
5. „ Acta dermatovenerol. X, 1929.
6. Erös: Zbl. Pathol. 54, 385, 1932.
7. Danckwortt: Die Luminiszenzanalyse.
8. Haitinger: Mikrochemie 9/10 1931/32.
9. Haitinger und Hamperl: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 33, 1933.
10. Hamperl: Z. mikrosk.-anat. Forsch. 2, 506, 1925.
11. „ Virch. Arch. 266, 509.
12. „ Z. mikrosk.-anat. Forsch. 27, 1, 1931.
13. „ Virch. Arch. 285, 811.
14. „ Virch. Arch. 282, 723.
15. Havliček: Bruns. Beitr. z. klin Chir. 154, 254.
16. Heimstädt: Zschr. f. wiss. Mikr. 28, 330.
17. Hymanns v. d. Berg: Dtsch. med. Wschr. 1928, Nr. 36.
18. Keller: Dermatol. Wschr. 82, 1926.
19. Köhler: Zschr. f. wiss. Mikr. 21, 1904.
20. Metzner: Mikrochemie 9/10 1931/32.
21. Pringsheim: Fluoreszenz und Phosphoreszenz, Springer 1923.
22. Policard: Compt. rend. Bd. 91.
23. „ Compt. rend. Bd. 92.
24. Setschenow: Virch. Arch. 281.
25. Stübel: Pflügers Arch. Physiol. 142, 1.
26. v. Weimarn: Zschr. f. Chem. und Ind. d. Koll. II, 175.

9. Lebenslauf.

Als Sohn des Fabrikanten Alfred Weddigen bin ich am 2. 5. 1912 in Wuppertal-Barmen geboren. Nach vierjähriger Schulzeit in einer Remscheider Volksschule trat ich Ostern 1922 in die Städtische Oberrealschule in Remscheid ein, die ich bis zur Reifeprüfung Ostern 1931 besuchte. Am 1. 4. 1931 wurde ich als Sanitäts-Offizieranwärter in das Ausbildungs-Bataillon I. R. 5, Greifswald, zur militärischen Ausbildung einberufen. Wintersemester 1931/32 bis Sommersemester 1933 war ich bei der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg immatrikuliert, wo ich am 22. Juni 1933 meine ärztliche Vorprüfung bestand. Wintersemester 1933/34 studierte ich in Berlin, Sommersemester 1934 an der Universität Königsberg. Mit Neueröffnung der Militärärztlichen Akademie im Oktober 1934 wurde ich nach Berlin kommandiert, wo ich bis zur Beendigung meiner ärztlichen Hauptprüfung am 29. 8. 36 studierte. Am 31. 8. 1936 wurde ich zum Standortlazarett Hannover versetzt, wo ich mein praktisches Jahr als Unterarzt ableistete.

Die Bestallung als Arzt wurde mir am 8. 11. 37 verliehen. Seit dem 12. 10. 37 bin ich als Truppenarzt in Hildesheim tätig.